

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION DE AGRONOMIA

DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA



Determinación y Cuantificación De Fósforo Solubilizado por Bacterias Aisladas de
(*Nicotiana glauca Graham*).

Por:

Lourdes Gordillo Melgoza

Tesis:

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

Ingeniero Agrónomo en Horticultura

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2012.

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA

Determinación y Cuantificación de Fósforo Solubilizado por Bacterias Aisladas de Solanáceas (*Nicotiana glauca*).

Por

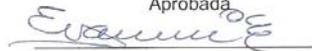
Lourdes Gordillo Melgoza

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

Ingeniero Agrónomo en Horticultura

Aprobada



Dr. Edmundo Rodríguez Campos

Asesor Principal



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Coasesor



Dra. Erika Vázquez Guzmán

Coasesor

Dr. Leobardo Bañuelos Herrera

Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2012

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por permitirme formarme como profesionalista, enseñarme el valor que tiene la agronomía para la humanidad, así como la responsabilidad que se asume al llegar a ser ingeniero.

Al Dr. Edmundo Rodríguez Campos, Responsable del proyecto por los conocimientos y experiencias compartidos, así como su contribución en esta investigación.

Al Dra. Erika Vázquez Guzmán, investigador del proyecto por su amistad y confianza para permitirme trabajar en este proyecto, así como la disponibilidad para mejorar esta investigación en todos sus aspectos.

A todos los **profesores de la universidad** que me impartieron clase, por su vocación de servicio, los conocimientos adquiridos así como las buenas y malas experiencias, que al final del camino me hicieron la persona que hoy en día soy.

A mis **compañeros de generación CXII de Horticultura**,

Por los momentos vividos, la complicidad que hubo entre muchos de nosotros, las risas, llantos, momentos buenos y malos, gracias a todos.

DEDICATORIAS

A mis padres: Imelda Melgoza López.

Alfredo Gordillo Utrilla.

Por darme la vida y ser la gran inspiración de mi existir, ser un ejemplo a seguir y darme una educación que no se encuentra en las aulas, por ustedes aprendí a valorar la vida y todo lo que la rodea, respetar, valorar y conservar una amistad, pareja o persona valiosa. gracias por todo el amor que me han dado por sus consejos y por haber hecho de mi una persona honesta, respetuosa, jamás podré pagarles todo lo que han hecho y sé que harían por mí, pero esta tesis es una muestra de lo que puedo lograr con el apoyo de las mejores personas que pude tener en la vida, esto es el principio de muchas satisfacciones que podré darles en la vida gracias mamá, gracias papá los amo con todo mi ser.

A mis hermanos: Maria Cecilia, Rosa, Hector Alfredo, Francisco Alfonso, Imelda y mis consentidos Raul, Cristian Enrique.

Por todo lo que hemos vivido a través de nuestras vidas por los juegos, las risas y el llanto por que he aprendido mucho de ustedes.

Al Ing. Juana Esmeralda Perez, Flor Gonzalez y Alejandra Rios por su amistad incondicional, porque siempre he tenido en él una persona con quien hablar, que me ha visto crecer a través de los años de estancia por una sincera amistad, por los momentos tristes y los ratos felices, que me has dado, saben que siempre podrán contar con migo no me queda más que decirte gracias AMIGAS.

A mis amigos durante la trayectoria compartieron momentos felices conmigo **Guadalupe, Elena, Claribel, Nayeli, Alma, Jorge, Oscar, Mayeni, Melki, Elida, Carmen, Ángeles, Jazmín, Flor, Ana, Marcelino, Marta, Sandra Luz, Valeriano.**

Índice de Contenido

CONTENIDO	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVO	3
III. HIPÓTESIS	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
El fósforo como nutriente en las plantas y su importancia	4
Ciclo del fósforo	7
Microorganismos solubilizadores de fosfato	11
Los Biofertilizantes	15
Solanáceas utilizadas en el estudio el tomate y la papa	15
<i>Nicotiana glauca (Graham)</i>	18
V. MATERIALES Y MÉTODOS	19
1. Materiales y reactivo	19
a. Biológico	19
b. Reactivos	20

c. Equipo	20
2. Metodologías empleadas	20
a. Cuantificación de microorganismos	20
b. Determinación de fósforo por método ANSA	22
3. Protocolo para la evaluación de fósforo solubilización por bacterias de la rizósfera de tomate en medio líquido	25
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
a. Evaluación de fósforo solubilizado y pH	29
b. Determinación de la capacidad solubilizadora de fósforo disuelto de cada cepa	
c. Identificación de las bacterias solubilizadoras de fósforo	
VII. CONCLUSIONES	38
VII. RECOMENDACIONES	39
IX. BIBLIOGRAFIA	40

Índice de Cuadros

Tabla 1.	Compuestos de fósforo que predominan a diferentes niveles de pH.	6
Tabla 2.	Cepas utilizadas en el estudio.	20
Tabla 3.	Equipos empleados en este trabajo de tesis.	21
Tabla 4.	Propiedades bioquímicas de algunas bacterias de interés.	30
Tabla 5.	Fósforo disuelto por la cepa control en cada bioensayo.	34
Tabla 6.	Solubilización de fósforo por las cepas probadas en este trabajo y pH del medio obtenido al final de incubación.	35
Tabla 7.	Identificación de las bacterias solubilizadores de fósforo mediante pruebas bioquímicas y de ADN.	39

Índice de Figuras

Figura 1.	Ciclo del fósforo.	8
Figura 2.	Los cambios de la población de bacterias, capacidad de solubilizar fósforo y el valor de pH en medio líquido durante el fosfato tricálcico incubación con Burkholderian cepa CC-AI74 de 199 h.	10
Figura 3.	Solubilización de compuestos inorgánicos del dósforo por producción de ácidos orgánicos.	10
Figura 4.	Variación del pH y de la cuenta viable en el medio NBRIP líquido con los días de incubación.	32
Figura 5.	Curvas de calibración en los diferentes ensayos para medir fósforo disuelto.	34
Figura 6.	Correlación entre pH y el fósforo disuelto con las diferentes cepas.	37

RESUMEN

En la presente tesis se estudió la habilidad fisiológica para solubilizar fosfato inorgánico de diferentes grupos bacterianos aislados de la rizósfera de el tabaquillo (*Nicotiana glauca*, Solanáceae). Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación enfocado al desarrollo de un biofertilizante para coadyuvar en resolver la problemática de la baja biodisponibilidad del fósforo en diferentes cultivos, llevado a cabo por el laboratorio de Agrobiotecnología, del departamento de Ciencias Básicas, División de Ingeniería.

Se evaluó la capacidad de solubilizar fosfato de 48 cepas bacterianas predominantes en la rizósfera de plantas de tabaquillo aisladas en trabajos anteriores llevados a cabo en el citado laboratorio. Los ensayos consistieron en el cultivo de las bacterias en medio líquido NBRIP que contiene como única fuente de fósforo al fosfato tricálcico insoluble. Después de 5 días de incubación, el fósforo solubilizado se cuantificó en el medio mediante la técnica ANSA. Se observó que las bacterias designadas como CBNG-11, CBLA, 47, 66, 68, 75, 100, 109, 124, 177, 200 fueron las mejores solubilizadoras de fósforo obteniéndose con ella, valores entre 500-700 ppm, de fósforo disuelto mientras que el resto de las bacterias sólo llegaron a solubilizar entre 300-500 ppm.

Palabras clave: Bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF) *Nicotiana Glauca*, Cuantificación de fósforo.

I. INTRODUCCION

El fósforo es un elemento importante para los seres vivos ya que forma parte de diferentes biomoléculas, como el DNA, RNA, ATP, NADP y fosfolípidos. En las plantas es uno de los tres elementos más importantes para el desarrollo y la obtención de buenos rendimientos en los cultivos, principalmente en los de tomate, *nicotiana glauca*, papa, maíz y sorgo. Su principal función fisiológica es intervenir en procesos de acumulación y liberación de energía durante el metabolismo celular (Conney, M. 2000).

El fósforo soluble es limitante para la producción de biomasa en un ecosistema natural (Hameeda *et al.*, 2006), donde el 95% es fijado rápidamente por los componentes del suelo (Fernández *et al.* 2005). Este fenómeno de fijación está ligado al pH del suelo. A pH superiores a 8.5, la asimilabilidad del fósforo es mínima, siendo a pH entre 6.5 a 7.5 cuando se lleva a cabo una asimilación óptima; ya que a pH mayor en el suelo rico en calcio, el fósforo reacciona y se precipita formando fosfato tricálcico, disminuyendo los valores de fósforo asimilable a menos de 30 ppm. Conforme se disminuye el pH del suelo, se favorece la formación de cargas positivas, lo que trae como consecuencia la fijación de aniones (ortofosfato). Sin embargo, a valores inferiores a 5, ocurre también deficiencia del fósforo en las plantas. A nivel mundial dos tercios del suelo arable es de tipo alcalino con pH mayores de 7 (Ahmed, 2011), por lo que el mayor problema para los cultivos es la solubilización de los fosfatos de calcio.

Debido a la necesidad de disminuir la dependencia de productos químicos artificiales en los cultivos que han deteriorado el equilibrio ecológico del suelo, a causa del agotamiento de la fertilidad, técnicas de monocultivo, sobrelaboreo, uso indiscriminado de fertilizantes químicos y pesticidas, entre otros; aunado con el crecimiento de la demanda en la exportación de papa y tomate y el aumento en la rigidez de las leyes en el sentido de utilizar agroquímicos menos tóxicos, se ha

obligado a buscar alternativas sustentables en el manejo de los cultivos. Una de estas alternativas es el empleo de Biofertilizantes, ya que representan un medio económicamente atractivo y aceptable para reducir los gastos de producción, además de mejorar y conservar los recursos naturales.

En México, el tomate rojo representa el 37% de las exportaciones de legumbres y el 16% del valor total de las exportaciones agropecuarias. La producción total nacional del cultivo de tomate tiene un valor de 14,900 millones de pesos en 54 mil hectáreas de cultivo. Los cinco estados con mayor superficie sembrada son Sinaloa, Michoacán, Baja California, Zacatecas y Nayarit. Sinaloa es la entidad con mayor superficie sembrada, con 14 mil Ha, lo que representa el 26% de la superficie total sembrada a nivel nacional y con una producción de 687,056.78 toneladas (SIAP, 2010). Actualmente en México, en el caso del tomate, se aplican aproximadamente 150 kilogramos de fósforo en cultivos al aire libre (Arellano-Gil, M. y Gutiérrez-Coronado, M. 2006) y 65 kg por hectárea en cultivo protegido en suelo (Garza Arizpe et al, 2008). En el caso de la papa se recomiendan 170 Kg/Ha de fósforo como ortofosfato, HPO_4^{2-} , (Rueda, *et. al.* 2009).

II. HIPÓTESIS.

Las bacterias aisladas de la rizósfera de tabaquillo (*Nicotiana Glauca*, Solanácea) y que han crecido en medio de NBRIP sólido, mostrarán diferencias significativas entre cepas en cuanto a su capacidad de solubilizar fosfato tricálcico en un medio de cultivo líquido y habrá cepas suficientemente eficientes para ser utilizadas en la formulación de un biofertilizante.

III. OBJETIVOS.

OBJETIVOS GENERALES

- Cuantificar la capacidad solubilizadora de fósforo de cepas bacterianas aisladas de *Nicotiana glauca*.
- Identificar y seleccionar las mejores bacterias solubilizadoras de fósforo a partir de fosfato tricálcico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer el protocolo para la evaluación del fósforo disuelto en el medio líquido.
2. Evaluar las diferentes cepas de bacterias, en cuanto a la disolución de fosfato tricálcico en medio NBRIP líquido.
3. Hacer pruebas bioquímicas para la identificación de las cepas.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA.

El fósforo como nutriente en las plantas y su importancia.

El fósforo es un componente esencial de los vegetales, cuya riqueza media en forma de P_2O_5 es del orden del 0.5 al 1 % de la materia seca. Se encuentra en parte en estado mineral, pero principalmente formando complejos orgánicos fosforados con lípidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y otros compuestos como la fitina (hexafosfato de inositol, una forma de almacenamiento de fósforo en las semillas). Juega un papel vital en todos los procesos que requieren transferencia de energía en la planta. Ya que los fosfatos de alta energía, encontrados en el adenosin difosfato (ADP) y en el adenosin trifosfato (ATP), son la fuente de energía que empuja una multitud de reacciones químicas dentro de la planta. Donde la transferencia de los fosfatos entre estos compuestos a otras moléculas (fosforilación) es el factor desencadenante de una gran cantidad de procesos celulares en las plantas (Elías Afif Khouri, 2005).

Comúnmente, el fósforo forma parte los compuestos fertilizantes más importantes para el agricultor, ya que el fósforo es considerado como un factor de crecimiento, al igual que el nitrógeno, sobre todo durante la primera fase del desarrollo de la planta, particularmente el radicular. Además aumenta la resistencia de la planta al frío y a las enfermedades. En términos generales, puede decirse que es un elemento regulador de la vegetación y por tanto, un factor de calidad, al favorecer los periodos de vegetación que son críticos para el rendimiento del cultivo: fecundación, maduración y movimiento de las reservas (Guerrero, 1990). Las carencias de fósforo en las plantas se ponen de manifiesto por un follaje de color verde oscuro, casi azulado, acompañado por el amarillamiento y secado de la punta de las hojas y una ondulación característica, mostrando, a veces, manchas púrpuras. (Alexander, M.1987).

En la naturaleza, el fósforo forma parte de las rocas y los minerales del suelo. Sin embargo, las plantas absorben únicamente el fósforo que está en la solución del suelo en forma de HPO_4^{-2} (ión fosfato monoácido) y $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ (ión fosfato diácido). Por lo que cualquier fertilizante, ya sea de origen orgánico o mineral, debe transformarse primero en esas formas químicas antes de ser utilizado por el cultivo. Los fertilizantes minerales son compuestos inorgánicos de fósforo que se extraen de los grandes yacimientos de "roca fosfórica". Estos compuestos minerales, son tratados para hacerlos más solubles para que así, sean disponibles para las plantas y puedan ser utilizados por estas en la formación de tejidos y órganos vegetales.

Las diferencias entre los residuos orgánicos y los fertilizantes minerales son principalmente dos: 1) la velocidad de disponibilidad para el cultivo pues los residuos orgánicos tienen que ser primero descompuestos por los microbios, mientras que los abonos minerales ya tienen los compuestos en la forma que la planta los utiliza y 2) la concentración, ya que los residuos orgánicos tienen concentraciones más bajas de fósforo que los compuestos minerales. Para garantizar una producción rentable y devolver al suelo el fósforo que ha sido extraído por la cosecha, los agricultores deben aplicar fósforo a sus cultivos. Es esta la forma de asegurar la fertilidad y la calidad del recurso suelo.

La principal razón por la cual el fósforo elemental (P) no se encuentra en estado libre en la naturaleza es debido a su facilidad de oxidación (Teuscher *et al.* 1965). Es muy abundante en la corteza terrestre, sin embargo, sólo una pequeña proporción está disponible para las plantas, por lo que debe ser suministrado por medio de fertilizantes. El principal inconveniente del empleo de los fertilizantes minerales es que gran parte del fósforo suministrado tiende a acumularse en el suelo en forma de compuestos insolubles. En la materia orgánica se halla contenido en varios compuestos orgánicos complejos (lecitina, ácidos nucleicos, fitina, etc.) los cuales son atacados y descompuestos por las bacterias y hongos del suelo por

medio de enzimas como la “fitasa”, liberándose el fósforo en forma de fosfatos o de ácido fosfórico (Teuscher *et al.* 1965).

La solubilidad de estos fosfatos está bajo el control de varios factores. Uno de ellos es la cantidad total de fosfato en fase sólida que existe en el suelo. Cuanto mayor es la cantidad total presente en el suelo, mayor es la posibilidad de que este último tenga más fósforo en solución. Otro factor importante es el nivel de contacto que existe entre el fosfato en fase sólida y la solución del suelo. La mayor exposición del fosfato a la solución del suelo y a las raíces de las plantas, aumenta la capacidad para que exista una reserva adecuada de fósforo (Asociaton, 1995). Sin embargo, el factor decisivo para el aprovechamiento de los fosfatos en el suelo, es sin duda el valor del pH, puesto que de él depende la existencia de diferentes fosfatos. El fosfato dicbásico, que es uno de los más fácilmente aprovechables, existe solo entre pH 6 a 7. Por debajo de pH 6 aumenta la solubilidad de los compuestos de hierro y aluminio, formándose fosfatos de hierro y aluminio insolubles. Por encima de pH 7.5 se forman fosfatos tricálcicos que son prácticamente insolubles (Teuscher *et al.* 1965).

Tabla 1. Compuestos de fósforo que predominan a diferentes niveles de pH. Teuscher *et al.* (1965).

pH	Fosfatos combinados principalmente con	Solubilidad
3-4	Hierro y aluminio	Insoluble
5-6	Hierro	Insoluble
6-7.8	Calcio (como CaHPO_4) Sodio (como Na_2HPO_4)	Fácilmente soluble Soluble
7.0	potasio (KH_2PO_4)	Pocos soluble
Mayor a 7.8	Calcio [como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]	Insoluble

El ciclo del fósforo

La mayor parte de los fosfatos aplicados como fertilizantes químicos son inmovilizados en el suelo por los fenómenos de fijación y adsorción y como consecuencia no son solubles para ser aprovechados por los cultivos (Peix *et al.* 2001). Por lo tanto se considera que la solubilización de las diferentes formas de rocas fosfatadas y de otras fuentes de fósforo inorgánico por los microorganismos del suelo es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutriente disponible para las plantas (Illmer & Schinner 1992). En la figura1 se muestra el ciclo del fósforo en la naturaleza y la intervención del hombre en el mismo.



El fósforo y su interacción con plantas, microorganismos y componentes del suelo.

Como ya se mencionó anteriormente, muchos de los fosfatos de la corteza terrestre son insolubles en agua lo que hace que su disponibilidad no sea apropiada. Estos fosfatos pasan a ser solubles de la tierra al agua por los fenómenos de lixiviación que sufre el suelo, y no al revés (porcentaje mínimo). En general este proceso involucra tres pasos:

1. Mineralización. El proceso de mineralización se encuentra en relación con la degradación de la materia orgánica por los microorganismos. Las situaciones que favorecen esta degradación son: un sustrato carbonado degradable y la presencia de nitrógeno.
2. Solubilización: El fósforo se encuentra en continuo movimiento desde su forma soluble a depósito de fósforo, aquí muchas bacterias autótrofas se encargan de llevar a cabo la solubilización. (Picone, L., Zamuner, E. 2002).
3. Inmovilización: El fósforo inorgánico se transforma en fósforo orgánico a través de diferentes seres vivos (en el agua, las algas llevan a cabo la absorción, en el suelo, las bacterias se encargan de su fijación) (Figura1).

El fósforo orgánico está compuesto, por varias fracciones, siendo el componente orgánico central la biomasa microbiana. Esta es una fracción lábil controlada por los factores ambientales y por aquellos relacionados con el manejo de los suelos. (Picone, L., Zamuner, E. 2002). Este tipo de fósforo tiende a ser adsorbido sobre las arcillas, por lo cual se podría esperar contenidos superiores de fósforo orgánico en suelos arcillosos que en arenosos o francos. Siendo las principales formas de fosfatos orgánicos, el fosfato de inositol y los ácidos nucleicos, los cuales tienen origen principalmente microbiano. Por lo que el nivel de fósforo orgánico en los suelos puede variar entre un 3 y un 85% del fósforo total (Martínez Fariás. 2004). Por otro lado el fósforo inorgánico se encuentra formando parte de minerales, principalmente de las apatitas, la estregita y la variscita, que pueden liberar fósforo muy lentamente por meteorización. Los compuestos formados pueden encontrarse en forma de sales

en solución, sales cristalinas o sales absorbidas por los coloides del suelo. El ión fosfato puede, además, ser directamente absorbido por los coloides del suelo o puede formar enlaces de gran estabilidad con los hidróxidos de Fe, Al o Mn que forman parte de los coloides del suelo. (Martinez Farias. 2004).

Los microorganismos son encargados de realizar algunas transformaciones de los compuestos orgánicos e inorgánicos del fósforo. Tales transformaciones se llevan a cabo por mecanismos como alteración en la solubilidad de los compuestos inorgánicos, mineralización de los compuestos orgánicos, inmovilización y oxidación-reducción de los compuestos inorgánicos (Alexander, 1987).

La mineralización es la conversión microbiana del fósforo orgánico a $\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$ o HPO_4^{2-} (ortofosfato), que son formas de fósforo disponibles para las plantas. El fósforo orgánico puede ser mineralizado como subproducto del proceso de mineralización de la materia orgánica del suelo o mediante la acción de enzimas específicas que son reguladas por la demanda de este nutriente (Picone y Zamuner, 2002). Este proceso está mediado por las enzimas fosfatasas ácidas que pueden ser sintetizadas por las raíces de las plantas, (Ridge y Rovira, 1971), y las fosfatasas ácidas y alcalinas producidas y por los hongos y bacterias. (AGROPECT Star, 2002). Entre los compuestos orgánicos del fósforo que comúnmente pueden estar presentes en el suelo se encuentran la lecitina, los ácidos nucleicos y la fitina los cuales en presencia de fuentes de carbono y nitrógeno de fácil asimilación para los microorganismos pueden ser degradados por acción de estas enzimas liberando fosfatos (Figura 2) (Alexander.,1987)



ACIDO FITICO FOSFATO DISPONIBLE

Ecuación. Oxidación de la fitina. Fuente: Alexander, 1987.

El mecanismo de solubilización en los suelos se favorece cuando estos presentan pH bajos, con un bajo contenido en calcio y alto contenido de materia orgánica (Guerrero, 1990), además depende también del contenido de fósforo presente en la solución de suelo.

Los fosfatos insolubles que no pueden ser asimilados por las plantas, pueden ser llevados a formas solubles por la acción de muchos microorganismos vía solubilización mediante la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, como el oxálico, cítrico, láctico succínico, isovalérico, isobutírico y acético, se producen en el suelo como resultado de la descomposición de la materia orgánica, donde la cantidad y tipo de estos ácidos orgánicos depende de los tipos de microorganismos encontrados en el suelo (Otalora, J., Patiño, L., Martínez, M., Pedroza, A. 2003). Se ha reportado que la presencia de los ácidos orgánicos son necesarios para que haya solubilización, ya que solo cuando el pH desciende hasta valores aproximados a 3.5 la solubilización de fósforo aumenta significativamente (Ta- Fa Lin, Hsin-I Huang, 2005). Otra forma por la cual los ácidos orgánicos actúan es por competencia con el fósforo por los sitios de absorción en las partículas de suelo con minerales de aluminio y hierro cuando se encuentran en su forma aniónica, esto trae como consecuencia el aumento de la solubilización del fósforo, al cambiar las cargas superficiales de las partículas de suelo o diluyendo su concentración en dichas partículas (Otalora, J., Patiño, L., Martínez, M., Pedroza, A. 2003).

Microorganismos solubilizadores de fosfato.

Algunos microorganismos solubilizan el fosfato mediante procesos de producción de ácidos orgánicos, fosfatasas, quelatación y reacciones de intercambio (Drouillon y Merckx, 2002; Johson y Loeppert., 2006; Begonia et al., 2004 y Onthong *et al.*, 2007). Diversos investigadores han reportado la capacidad que tienen diferentes especies bacterianas para solubilizar compuestos fosfatados inorgánicos como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxapatita y roca fosfórica (Chen et al, 2006; Ivanova et al, 2006 y Mkanová, 2002). Entre estas se incluyen bacterias Gram negativas y Gram positivas, incluso algunas especies de *Streptomyces*, (Moura et al., 2001). Las principales bacterias que se han estudiado son especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Burkholdelia*. Estas bacterias se caracterizan por presentar producción de ácidos orgánicos que ayudan a la solubilización de los minerales de fósforo, la producción de polisacáridos extracelulares y la producción de enzimas como la fosfatasa alcalina (Moura et al., 2001). De igual forma se han reportado otros microorganismos solubilizadores de fosfato como: *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. Atrophaceus*, *Paenibacillus macerans*, *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. taylorae*, *E. asburiae*, *Kluverya cryocrescens*, *Pseudomonas stutzeri* entre otros (Vásquez *et al.*, 2000).

En Colombia se han realizado diversos estudios sobre el aislamiento y evaluación de este tipo de microorganismos. Sobre bacterias ya existen datos que demuestran el gran potencial de éstas con respecto a la solubilización de fosfatos. Por el contrario, en el caso de los hongos los datos son escasos. Useche *et al* (2004), investigó en suelos ácidos amazónicos de bosques poco intervenidos, en rastrojos y pastizales la presencia de hongos y bacterias fosfato solubilizadores. Estos investigadores realizaron un gran aporte en cuanto a la identificación de nuevas especies de bacterias BSF en Colombia tales como *Pseudomonas spp.*, *P. cepacia*, *P. gladioli*, *Xanthomonas spp.*, *X. maltophilia*, *Enterobacter agglomerans*, *Chromobacterium sp.*, *X. maltophilia*, *Chromobacterium sp.* y *P. gladioli*. Entre los

hongos solubilizadores de fosfato se encuentran *Penicillium spp.*, *P. implicatum*, *P. cýtreo-viridae*, *Paecilomyces spp.*, *Aspergillus níger*, *A. fumigatus*, *Scopulariopsis sp.*, *Moniliella sp.*, *Mortierella sp.*, y un ascomiceto. Vera *et al* (2002), realizó el aislamiento y caracterización de hongos fosfato solubilizadores de la rizósfera de cultivos de Arazá un frutal de colombia, empleando dos fuentes de fósforo inorgánico para la solubilización. En este trabajo se identificaron microorganismo solubilizadores del fosfato de calcio como *Trichoderma aureoviride*, *Aspergillus aculeatus*, *Trichoderma cepa 1* y *Trichoderma cepa 2*. Así como para el fosfato de hierro, *Aspergillus oryzae*, *Paecilomyces cepa 3*, *Gongronella butleri* y *Fusarium oxysporum*.

Otra característica importante de estas bacterias, es que además pueden producir otros metabolitos fitohormonas, fijar nitrógeno, o eliminar metabolitos tóxicos, para promover el crecimiento, inducir defensas o inhibir patógenos. Algunos exhiben una estrecha especificidad mientras que otros pueden tener un amplio espectro de huéspedes (Kloepper *et al*, 1989).

Los Biofertilizantes

El término de agricultura orgánica, se refiere al proceso que utiliza métodos que respetan el medio ambiente y que evita el uso de productos químicos como fertilizantes, insecticidas y herbicidas en plantas, que pueden causar contaminación de los alimentos y degradación cuantitativa y cualitativa de los suelos, del agua y de todos los recursos esenciales para lograr incrementos en la producción de alimentos (Organización Americana de Alimentos - FAO, 2001). A nivel mundial, México ocupa el 18° lugar por superficie orgánica y está ubicado en el contexto internacional como país productor – exportador de alimentos orgánicos y como primer productor de café orgánico. En el país, el sector orgánico es el subsector agrícola más dinámico, pues ha aumentado su superficie cultivada orgánicamente de 23 000 Ha en 1996 a 103 000 Ha en 2000. Para 2002 se estimó que alcanzó las 216 000 Ha. Esta agricultura

fue practicada por mas de 33 000 productores en 262 zonas de producción de 28 estados de la república, lo cual generó 139 millones de dólares en divisas y 16.4 millones de jornales por año. De acuerdo con las estimaciones del 2002, el número de los productores orgánicos fue de 53 000 y la generación de divisas fue de 280 millones de dólares (Gómez *et al.* 2004).

Uno de los principales problemas en la agricultura es el desconocimiento de las especies presentes en los agroecosistemas y en la rizósfera de los cultivos para su posible empleo. Desde el punto de vista ecológico, es importante reconocer a los integrantes de la comunidad bacteriana que tienen potencial como inoculantes y proporcionan un efecto agrobiológico positivo en los cultivos agrícolas (Terry *et al.* 2005). Como consecuencia del conocimiento acerca del funcionamiento de los integrantes de los agroecosistemas, pueden surgir los biofertilizantes.

Los biofertilizantes son preparados con microorganismos aplicados al suelo y/o plantas que tienen como finalidad sustituir parcial o totalmente la fertilización sintética. La respuesta a los biofertilizantes varía considerablemente debido principalmente a que los microorganismos aplicados deben competir con una microflora nativa mejor adaptada a condiciones ambientales adversas, incluyendo falta de humedad en el suelo, alta salinidad y pH extremos, que pueden disminuir rápidamente la población de cualquier especie microbiana introducida. Por lo que se ha reportado es recomendable, el empleo de cepas nativas de microorganismos en la elaboración de biofertilizantes, ya que tienen mayor posibilidad de efectividad en el campo, al estar más adaptados a las condiciones del suelo de cada región. Los microorganismos que promueven el crecimiento en las plantas (plant growth promoter rhizobacteria o PGPR), entre ellos los solubilizadores de fósforo, desempeñan un importante papel en el aporte de este nutrimento para las plantas, propiedad que potencia su utilización como inoculantes en forma de biofertilizantes (Glick, 1995). Los microorganismos del suelo contribuyen al aprovechamiento del fósforo por las plantas, a consecuencia de los diversos ácidos que producen y que aumentan la solubilidad de los fosfatos que son insolubles o casi insolubles. Se ha

calculado que un 35% de todas las bacterias del suelo pueden disolver fosfato tricálcico, y dado que la conversión se realiza de manera más efectiva en la inmediata vecindad de las puntas de las raíces, donde abundan estos microorganismos a consecuencia de las excreciones radicales, no es despreciable esta conversión. (Teuscher *et al.* 1965).

Un biofertilizante se define como una sustancia que contiene microorganismos vivos, que cuando se aplica a superficies de plantas, semillas o suelo coloniza la rizósfera o el interior de la planta y promueve el crecimiento al aumentar el suministro o la disponibilidad de los nutrientes principales para la planta huésped. Ya que los biofertilizantes contienen organismos vivos que aumentan el estado de los nutrientes de la planta huésped a través de su continua existencia en asociación con la planta, esta definición separa al biofertilizante del abono orgánico (fertilizante que contiene compuestos orgánicos que directamente o por deterioro aumentan la fertilidad de los suelos). Okon y Labandera-González.(1994). Argumentan que los organismos rizosféricos mejoran la utilización de los nutrientes del suelo, pero no reemplazan los nutrientes (como los fertilizantes químicos).

Solanáceas utilizadas en el estudio.

El tomate y la papa.

El tomate y la papa se ubican entre los cultivos más importantes para la alimentación humana, tanto en América como en Europa. A escala mundial ambos cultivos sobresalen al contribuir el 47% de la producción de hortalizas, seguidas por la col, la sandía y la cebolla. En el comercio internacional de hortalizas el 70% se encuentra centrado en 7 productos: papa, tomate, cebolla, sandía, pepino, lechuga y melón (SIAP, 2010). Se considera que a nivel internacional, las hortalizas junto con las frutas ocupan en nuestros días el segundo lugar entre los productos agropecuarios de mayor consumo, apenas aventajadas por los cereales. Se estima que tan solo dos hortalizas contribuyen con el 50% de la producción en el mundo: la papa y el jitomate, lo cual nos indica el enorme valor que este último cultivo

representa no solo en el comercio, sino también en el sistema alimentario mundial. El jitomate o "tomate rojo" es originario de América del Sur, aunque se considera a México como centro de su domesticación. Con la llegada de los españoles se expandió al viejo continente y de ahí a todo el mundo. Con su comercialización y difusión lograda, actualmente forma parte de la dieta alimenticia de varias culturas en el globo terráqueo. A nivel mundial el tomate ocupa el segundo lugar entre las hortalizas, en México es la más importante tanto para la generación de empleos como por la aportación de divisas derivadas de las exportaciones (Arellano y Gutiérrez, 2003). La producción total nacional del cultivo del tomate tiene un valor de 14,900 mdp, con 54 000 Ha sembradas. Siendo los cinco estados con mayor superficie sembrada Sinaloa, Michoacán, Baja California, Zacatecas y Nayarit. Tan sólo Sinaloa es la entidad con mayor superficie sembrada (14 000 Ha), lo que representa el 26% de la superficie a nivel nacional y cuenta con una producción de 687,056.78 ton, el 30% de la producción nacional (SIAP, 2010). A nivel mundial varios países son importantes productores y en algunos de estos la alimentación se basa en gran medida en este cultivo (Garzón, 2007). Por lo que el jitomate o "tomate rojo" es una de las especies hortícolas más importantes de nuestro país debido al valor de su producción y a la demanda de mano de obra que genera. Es el principal producto hortícola de exportación, ya que representa el 37% del valor total de las exportaciones de legumbres y hortalizas y el 16% del valor total de las exportaciones agropecuarias, sólo superada por el ganado vacuno (SIAP, 2010). El jitomate se prefiere consumir fresco, pero también es utilizado como producto industrializado para elaborar pastas, salsas, purés, jugos, etc., gracias a los avances tecnológicos para su procesamiento y a las modificaciones en los gustos y costumbres de las nuevas generaciones, lo que exige calidad en cuanto a su distribución y venta en fresco, determinando y condicionando nichos de mercado.

En México, la papa ocupa el cuarto lugar en importancia en cuanto a superficie sembrada, después del trigo, el maíz, el arroz y algunos cultivos como la soya y la caña de azúcar (CONPAPA, 2008). El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) es una actividad económica importante. Según datos del SIAP (2010)

en México, la superficie sembrada es de 54,141.36 Ha, con una producción anual aproximada de 1, 500,497.23 ton y un rendimiento promedio de 27.74 kg/Ha. Siendo los cinco estados con mayor superficie sembrada Chiapas, México, Durango, Tlaxcala, Hidalgo. La Papa es un tubérculo comestible que crece bajo el nivel de la tierra con raíces muy ramificadas, finas y largas; el tallo, grueso, fuerte, anguloso, con una altura que varía entre 0.5 y 1 m. Se origina en las yemas del tubérculo; las hojas son imparipinadas; su fruto es una baya redondeada de color verde, que se vuelve amarilla al madurar. La planta también tiene tallos subterráneos, los primeros son de color verde, se convierten en su extremidad en tubérculos. En la superficie de los tubérculos tienen yemas distribuidas en forma helicoidal. La Papa es una especie cuya principal función fisiológica es almacenar o acumular gran cantidad de nutrientes en los tubérculos. Se utiliza generalmente en la gastronomía para la elaboración de guisoso, ensaladas, púres, papas fritas y en la industria de frituras y para la elaboración de Vodka, ya que para su elaboración requiere de grandes cantidades de almidón. El mejoramiento genético de la papa a contribuido a la creación de variedades de alto rendimiento, ya que el desarrollo de la industria de procesamiento de la papa va de acuerdo a los requerimientos del mercado y la participación competitiva de productores de menores ingresos en el mercado. Generalmente, la papa se caracteriza por ser un cultivo de ingresos altos, egresos altos y riesgos altos. Por lo que se requiere de un alto consumo de fertilizantes y pesticidas, y por lo tanto mano de obra adicional. Estas son las razones que motivan a los productores a realizar mayores inversiones en la papa que en otros cultivos (Douglas Horton, 1992).

Nicotiana glauca (Graham)

Es una solanácea silvestre, crece como arbusto leñoso, o como un árbol pequeño y se propaga también por gajos vegetativos. Si se cultiva en el interior, necesita más de 14 horas diarias de luz para poder florecer, es uno de los arbustos más comunes de lugares perturbados, es muy común encontrarla a orillas de caminos y carreteras, a lo largo de ríos y arroyos, cerca de cultivos y patios de casas, se adapta a

diferentes climas por lo que se desarrolla tanto en selvas caducifolias, bosques de pino-encino, matorrales xerófilo y en zonas áridas.

En el Valle de México se conoce hasta los 2650 m. En Veracruz se registra de los 1700 a los 2300 m (Nee, 1986). En cuanto a sus usos, las hojas frescas se aplican externamente en tratamiento de dolores de cabeza, cataplasmas en dolores reumáticos, heridas y úlceras, baños de asiento en hemorroides, etc. La especie no contiene cantidades significativas de nicotina, pero si anabasina, un alcaloide relacionado. Se la está investigando como posible cura para la adicción a la nicotina.

Al igual que *Nicotiana tabacum*, las hojas de esta especie son usadas para ser fumadas, generalmente con carácter ritual en el caso de algunos grupos aborígenes, pero también se las emplea como relleno en cigarrillos comerciales de menor calidad. No se recomienda su ingesta, por poseer componentes tóxicos. Es altamente tóxica para animales domésticos (Robert Graham, 1826).

Hojas de *Nicotiana glauca* se hallaron en sitios arqueológicos de la cultura Nazca.

V. METODOLOGIA

1. Materiales y reactivos.

a. Material Biológico.

Las cepas seleccionadas para este trabajo de tesis se muestran en la tabla 1.

Tabla 2. Cepas utilizadas en este estudio

Cepas utilizadas en el ensayo.			
BLSP-02	BLSP-03	BLSP-04	BLSP-05
CBNG-14	CBNG-14	CBLA-15	CBLA-15
CBLA-129	CBNG-06	CBLA-177	CBLA-199
CBNG-08	CBLA-124	CBLA-187	CBLA-127
CBLA-70	CBLA-134	CBLA-178	CBLA-183
CBLA-69	CBLA-75	CBLA-194	CBNG-05
CBLA-122	CBLA-14	CBLA-172	CBNG-12
CBLA-133	CBLA-66	CBLA-160	CBLA-131
CBLA-15	CBLA-47	CBLA-179	CBLA-97
CBLA-67	CBLA-62	CBLA-173	CBLA-113
CBNG-07	CBLA-106	CBLA-205	CBLA-117
CBNG-11	CBLA-107	CBLA-191	CBLA-176
CBLA-68	CBLA-109	CBLA-13	CBLA-88
		CBLA-159	CBLA-92
		CBLA-163	CBLA-110
		CBLA-109	

b. Reactivos.

Los reactivos utilizados en la elaboración de medios y para la determinación de fósforo fueron de las marcas SIGMA, FERMONT, JALMEK Y ANALYTYKA.

c. Equipo.

Tabla 3. Equipos empleados en este trabajo de tesis.

EQUIPO	Centrifuga	Espectómetro	Shaker/incubador	Ultracongelador	pHímetro
MARCA	Thermo Scientific	Thermo Scientific	Thermo Scientific	Thermo Fisher Scientific	
MODELO	SL 40 R	Genesys 10 UV scanning	Max Q 5000	Revco VALUE PLUS	45-02-186

2. Metodologías empleadas.

a. Cuantificación de microorganismos.

De las 48 cepas seleccionadas en el trabajo de tesis se prepararon matraces con medio de cultivo por triplicado con un total de 144 matraces de 125ml con 30 mL de medio NBRIP líquido, cada uno se inoculó con 100 µl de suspensión de bacteria para evaluar la capacidad de solubilizar fosfato tricálcico. El crecimiento microbiano se define como un incremento en el número de células. Éste viene dado como consecuencia del crecimiento de cada célula individual y su división celular

Existen diversas formas de medir el crecimiento bacteriano, los más empleados son aquellos que utilizan parámetros distintos del número de células, pero que pueden relacionarse de forma directa con éste (masa celular, actividad metabólica, etc.) Esto es posible porque durante el crecimiento de un cultivo hay un

aumento ordenado de todos los constituyentes celulares y así la velocidad de crecimiento de la población puede estimarse por la velocidad del incremento de cualquiera de estos parámetros.

Uno de estos métodos se fundamenta en la medida de la turbidez del cultivo y se basa en la capacidad de las células y partículas en general de absorber y/o dispersar la luz que incide sobre ellas. Un cultivo celular aparece turbio porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión. La turbidez es proporcional al número de células y puede medirse utilizando un espectrofotómetro. El espectrofotómetro es un aparato que hace pasar la luz a través de una suspensión celular y detecta la luz no dispersada. Cuanto mayor sea el número de células mayor es la turbidez del cultivo o densidad óptica (DO) y menor la cantidad de luz no dispersada que emerge tras atravesar la muestra. Por tanto, la DO de un cultivo es proporcional a la densidad celular.

La determinación de la curva de crecimiento se llevó a cabo de la siguiente forma:

1. Se inoculó el matraz que contiene el medio de cultivo con un preinóculo que tenía una D.O. a 600 nm de 0.185.
2. Se siguió la evolución de la turbidez del cultivo midiendo la D.O. a diferentes tiempos durante 24 – 48 horas (según fue necesario). Y se tomaron muestras cada dos horas.

Determinación de fósforo por el método ANSA.

La determinación de fósforo disuelto consiste en la detección del ion ortofosfato en la solución por un método cuantitativo. En este caso se utilizó el método de ANSA recomendado para determinar el contenido de fósforo foliar por el departamento de horticultura de esta Universidad. Éste utiliza el principio de la

formación del complejo fosfomolibdico y la posterior formación de un color azul al reaccionar este complejo con el ácido aminonaftilsulfónico (ANSA) en donde la intensidad del color es proporcional al contenido de fósforo en la muestra.

Determinación de fósforo por el método ANSA.

a. La preparación de reactivos se hizo de la siguiente manera.

1. Molibdato de amonio

6.25 g de molibdato de amonio

50 mL de agua destilada

75 mL de ácido sulfúrico 10 N

Aforar a 250 mL con agua

2. ANSA. Ácido amino naftol sulfónico.

0.25 g ANSA

7.5 mL bisulfito de sodio 15%

25 mL sulfito de sodio 20%

Aforar a 500 mL.

Dejar reposar toda la noche y cubrir de la luz.

En caso de presentar residuos, filtrar con papel número 2.

Si no ocurre la dosilución, añadir 0.5 mL de la solución de sulfito de sodio

3. Agua regia.

300 mL HCl

100 mL HNO₃

Aforar a 1 L.

1. Preparación de la curva patrón.

Para la cuantificación de fósforo en las muestras se utilizó una curva patrón en cada experimento realizado, las soluciones utilizadas eran de fosfato de potasio monobásico con concentración de fósforo conocida, para esto se preparó una solución madre de fosfato de potasio monobásico que contenía 500 ppm de fósforo que se preparó con 0.2196 g de KH_2PO_4 en 100 mL de agua destilada. Con esta solución madre se prepararon diluciones desde 10 a 200 ppm siguiendo las indicaciones que se muestran en la tabla siguiente.

DILUCIÓN	mL de la solución Stock	Aforar a:
200 ppm	20 mL	50 mL
180 ppm	18 mL	50 mL
120 ppm	12 mL	50 mL
100 ppm	10 mL	50 mL
80 ppm	8 mL	50 mL
60 ppm	6 mL	50 mL
40 ppm	4 mL	50 mL
20 ppm	2 mL	50 mL
10 ppm	1 mL	50 mL

Valores determinados empleando la siguiente ecuación:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

2. Análisis de las muestras.

Se midió 1 mL de la muestra y 1 mL de cada una de las soluciones de la curva patrón. Se le agregaron 5 mL de molibdato de amonio y 2 mL

de ANSA. La solución resultante se agitó y reposó de 20 a 25 min. Y finalmente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 640 nm.

3. Análisis de resultados.

A partir de los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras de la curva patrón se realizó una gráfica con la concentración en el eje de las X y se obtuvo la ecuación de la recta.

$$y = mx + b$$

Donde se debe despejar la x que corresponde a las ppm de fósforo, empleando los datos obtenidos a partir de la ecuación de la recta (y = Absorbancia de cada una de las muestras analizadas).

El resultado se obtiene se refiere a las ppm de fósforo en solución.

Preparación de medios:

NBRIP:

Se preparó el medio NBRIP que consiste en 10 g de glucosa, 5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g de KCl, 0.1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 g de agar bacteriológico en 1000 ml de agua. Disolver las sales por separado antes de añadir el agar bacteriológico, agitar hasta completa disolución y esterilizar a 120°C/15 lbs por 15 minutos)

MEDIO PARA:

AZOSPIRILLUM:

Se preparó el medio Azospirillum con 40 mg de KH_2PO_4 , 10 mg K_2HPO_4 , $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg NaCl , en estos reactivos se pesaron 2 mg de CaCl_2 , 2 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, y 2 mg de $\text{Na}_2 \text{Mo O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ se disolvieron en 10 mL y se tomó 1 mL, 0.5 de Ac. Malico, 0.4 g de KOH , 0.2 g de extracto de levadura agitar en vortex en 100 mL líquido para 3 matraces de 125 mL.

3. Protocolo para la evaluación de fósforo solubilizado por bacterias de la rizosfera de tomate en medio líquido.

1. Se reactivaron las bacterias en placa de medio para *Azospirillum* a partir del vial en ultracongelamiento.
 - a. Apartir del vial del ultracongelador, con el asa se tomaron algunos cristales del cultivo congelado y se colocaron en una orilla de la placa de petri con medio para *Azospirillum*, posteriormente se distribuyeron en la placa por estría cruzada.
 - b. Se incubaron a 30°C por 18-24 horas.
2. Se tomó una colonia aislada y sembró en 10 mL de medio *Azospirillum* líquido en un tubo, incubando por 18 horas a 30°C y 200 rpm.
3. Se lavaron las células.

- a. Se colocó el cultivo celular en tubos cónicos estériles de 15 ml y se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos.
 - b. Se desechó el medio de cultivo y el paquete celular se resuspendió en 10 mL de solución salina y se repitió la centrifugación.
4. Las células libres de medio de cultivo se resuspendieron en solución salina y se ajustó la densidad óptica a 3×10^9 UFC/ml
- a. Uso de la ecuación que relaciona UFC con densidad óptica

$$\text{UFC} = 2 \times 10^{10}(\text{DO}) - 7 \times 10^8$$

$$\text{DO} = (\text{UFC} + 7 \times 10^8) / 2 \times 10^{10}$$

$$\text{DO} = (3 \times 10^9 + 7 \times 10^8) / 2 \times 10^{10}$$

$$\text{DO} = 0.185$$

5. Se inocularon matraces de 125 ml conteniendo 30 mL de medio NBRIP líquido con 100 μL de la suspensión de bacterias.
6. Se incubaron a 30°C a 200 rpm y se cosecharon 3 matraces a las 24, 48, 72 y 96 horas
7. Cosecha.
- a. De cada matraz, se tomaron 10 ml del cultivo y se colocaron en tubo cónico de 15 mL. Se centrifugaron por 10 minutos a 10,000 rpm a 5°C ,

se separó el sobrenadante y se filtró con papel numero 2 antes de determinar el contenido de fósforo.

8. Se determinó el contenido de fósforo en el medio de cultivo libre de células por el método de ANSA, utilizando curva de calibración de 10-150 ppm de fósforo.
9. Para evaluar el crecimiento bacteriano, se tomó otra una alícuota de 10 ml del cultivo y se le agregaron aproximadamente 1 mL de HCl 1N hasta disolver el fosfato tricálcico. Se midió la densidad óptica a 600 nm y utilizando la ecuación

$$DO = 2 \times 10^{10} UFC - 7 \times 10^8$$

Se estimaron los UFC/ml

Los ensayos fueron denominados como BSLP. En los ensayos BSLP-02 y BSLP-03 se utilizó como referencia la cepa CBNG-14, para el resto de los bioensayos se empleo la cepa CBLA-15, con ambas cepas se obtienen resultados similares.

4. Identificación de las bacterias solubilizadoras de fósforo.

La identificación de las cepas bacterianas se llevó a cabo mediante el empleo de pruebas bioquímicas según el Manual de Bergey's. Las principales pruebas bioquímicas empleadas fueron las siguientes:

- Gram. Se basa en la cantidad de peptidoglucano que se encuentra en las paredes celulares de estas bacterias. Las células Gram positivas se tiñen de color azul-violeta mientras que las Gram negativas de color rojizo.

- Prueba de la catalasa. Se utiliza para comprobar la presencia del enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo.
- Oxidasa. Se encuentra en organismos aerobios y anaerobios facultativos, utiliza el diclorhidrato de tetrametil-para-fenilendiamina que actúa como aceptor terminal de electrones. En presencia de oxidasa y oxígeno atmosférico se oxida formando azul de indofenol.
- Agar Mac Conkey. Este medio evalúa la capacidad de un microorganismo para crecer en concentraciones moderadas de sales biliares. Las sales biliares y el cristal violeta inhiben considerablemente la flora gram positiva.
- OF medio basal. Medio útil para detectar a los microorganismos glucidolíticos que degradan la glucosa ya sea por por mecanismos fermentativos u oxidativos.
- Agar Nitrato. Medio para bacterias Gram negativas aerobias o anaerobias facultativas para realizar la prueba de reducción de nitratos.
- SIM Medio. Es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno en un mismo tubo. Es útil para diferenciar miembros de la familia Enterobacteriaceae.

De acuerdo a esto, las bacterias pueden ser clasificadas de la siguiente forma:

Tabla 4. Propiedades bioquímicas de algunas bacterias de interés.

	E. coli	Enterobacteria	Coliformes	Pantoea	Citrobacter	Alcaligenes	Acinetobacter	Actinobacillus	Aeromonas	Pseudomona	Stenotrophomonas	Moraxella	Acromobacter	Azotobacter	Bordetella	Agrobacterium
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
O	-	-	-	+	-	+	-	+/-	+	+	-	+	+	+	+	+
AM	R	R	R	R	B	B	B	B	R	C	R	R	R	B	R	R
OF	F	F	F	F	F	NO	NO	F	F	O	O	O	O	O	O	O
N	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-/+	-/+	-/+	-/+	+	-	-
S	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+/-
I	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
M	+/-	+/-	+/-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+

R = Rosa, B= Blanca, C=Clara

Según los resultados obtenidos en cada una de las pruebas se designó el género de cada bacteria, la confirmación del género de las cepas se llevó a cabo mediante la secuenciación del gen del DNA 16S ribosomal. Las bacterias se reactivaron a partir de muestras congeladas en glicerol al 20%, posteriormente se hicieron crecer en medio líquido MA por 18 horas, al cultivo así crecido se le agregó glicerol estéril y se congeló en crioviales para su posterior envío a la empresa Macrogen, Seoul Korea del Sur, donde se secuenciaron al menos 1400 pb de la región del 16S ribosomal. Las secuencias fueron comparadas en línea mediante el programa BLAST con las secuencias similares depositadas en el GenBank. Se consideró una identificación positiva cuando la secuencia comparada tuvo mas de 99% de identidad con secuencias taxonómicamente identificadas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

a. Evaluación del fósforo solubilizado y pH.

Debido a la necesidad de establecer un tiempo para la evaluación de fósforo disuelto, el primer ensayo de esta tesis consistió en el establecimiento del tiempo necesario para la evaluación de fósforo disuelto. Para esto se inocularon 15 matraces por triplicado con medio NBRIP con la cepa CBNG 14 y se tomaron muestras cada 24 horas, determinándose pH, cuenta viable por plaqueo y fósforo disuelto en el sobrenadante por triplicado. En la figura 4 A se muestra la variación del pH y de la cuenta viable en el medio en matraces inoculados y sin inocular. Los datos obtenidos revelan que en los matraces sin inocular no existe variación en el pH; mientras que en los matraces inoculados, el pH empezó a disminuir desde el primer día, alcanzando su mínimo a los 4 días con un valor de 3.65. Después de ese tiempo el pH se mantuvo estable. En cuanto al crecimiento bacteriano, se observa una correlación inversa al cambio de pH. Existiendo un máximo de crecimiento a los 5 días (4.4×10^9 UFC/ml). En la figura 4 B se muestra la cinética de solubilización de fósforo, comparándolo con la variación de pH. Observándose la misma correlación inversa de la solubilización de fósforo con respecto al cambio de pH.

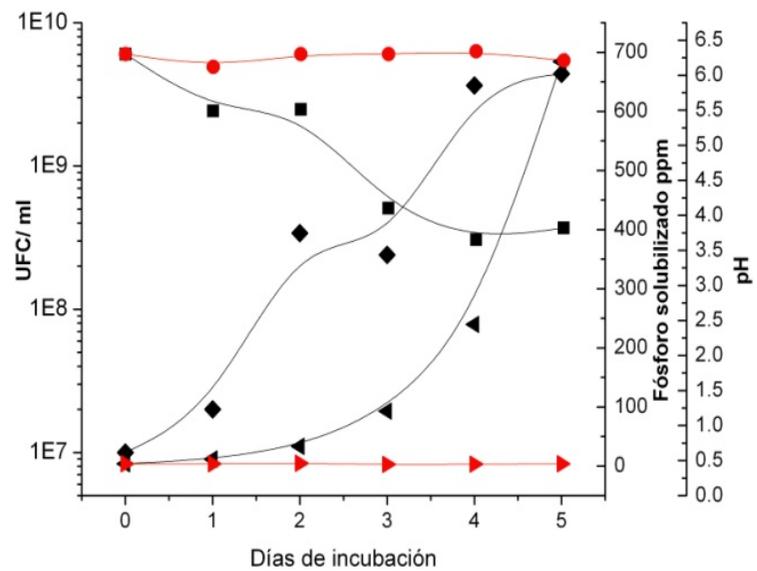


Figura 2. Variación del pH y de la cuenta viable en medio NBRIP líquido con los días de incubación. Panel A: ■ UFC/ml del medio inoculado, ● UFC/ml del medio sin inocular, ▼ pH del medio inoculado, ▲ pH del medio sin inocular.

De lo mencionado anteriormente, se puede apreciar que el máximo de solubilización (684 ppm) se obtuvo a los 5 días. La cinética ya no se continuó debido a que los valores de fósforo disuelto obtenidos a este tiempo eran mayores a los 233 ppm reportados por (Young, 1990) a los 4 días de incubación, y similares a los reportados por Collavino et al a los 10 días de incubación en un medio similar. Por lo que con estos resultados se determinó que la evaluación del resto de las cepas se haría hasta los 5 días de incubación.

Para la obtención de los resultados, en total se hicieron 4 ensayos para probar la totalidad de las cepas. Debido a que dichos ensayos se hicieron a distintos tiempos, se introdujo una cepa control en cada ensayo para validar la comparación de los resultados, en un inicio se utilizó la cepa CBNG-14 como cepa control, pero se encontró que dicha cepa es patógena y se cambió por la CBLA-15, en la tabla 5 se muestran los resultados de pH y solubilización de cada cepa probada, también para evaluar la validez de los resultados, se corrió una curva de calibración en la determinación de fósforo en cada ensayo, en la figura 5 se muestran las distintas curvas obtenidas y como se puede observar solo se encontró una pequeña variación en uno de los ensayos, por lo que se puede decir que todos los resultados son comparables en cuanto al fósforo medido. se hizo la regresión lineal a una de las curvas para obtener la ecuación y con ella calcular el fósforo disuelto por las cepas en cada matraz.

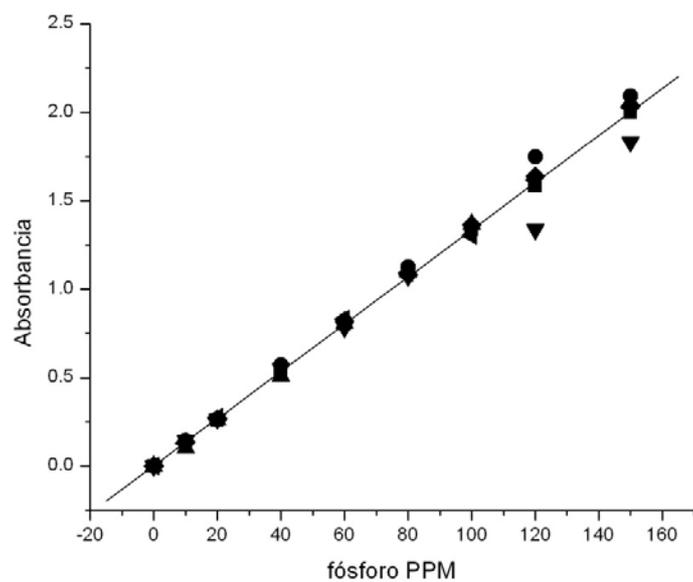


Figura 3. Curvas de calibración en los diferentes ensayos para medir fósforo disuelto. Ecuación de la curva $y=0.01327x + 0.0097$, teniendo ligeras variaciones en el valor de la ordenada en el origen

Tabla 5. Fósforo disuelto por la cepa control en cada bioensayo.

Ensayo	Cepa	P ppm	pH
BLSP-02	CBNG14	614	
	CBLA-15	707	4.24
BLSP-03	CBNG14	550	3.38
BLSP-04	CBLA-15	647	4.24
BLSP-05	CBLA-15	530	3.5

b. Determinación de la capacidad solubilizadora de fósforo disuelto de cada cepa.

En la figura 5 se presenta la comparación de las distintas curvas de calibración realizadas para establecer una curva patrón para llevar a cabo la determinación de fósforo disuelto. Se observan algunas variaciones, probablemente debidas a que estas curvas se llevaron a cabo a distintos tiempos de muestreo y a problemas de operación (preparación de reactivos, tiempos de preparación, etc.), factores que afectan significativamente los resultados obtenidos en la determinación de fósforo

Tabla 6. Solubilización de fósforo por las cepas probadas en este trabajo y pH del medio obtenido al final de la incubación.

Cepa	P mg/L	pH	Cepa	P mg/L	pH	Cepa	P mg/L	pH
CBNG-05	470.80	3.45	CBLA-75	703.72	3.32	CBLA-134	788.21	3.34
CBNG-06	533.46	3.3	CBLA-88	538.03	3.56	CBLA-159	291.90	4.21
CBNG-07	65.96	4.76	CBLA-92	560.22	3.57	CBLA-160	371.36	3.93
CBNG-08	333.72	3.8	CBLA-97	476.42	3.5	CBLA-163	676.18	3.95
CBNG-11	788.97	3.38	CBLA-100	795.90	3.3	CBLA-172	535.52	4.24
CBNG-12	393.21	3.63	CBLA-107	677.05	3.35	CBLA-176	507.37	3.7
CBNG-14	782.44	3.6	CBLA-109	836.67	3.36	CBLA-177	750.90	3.78
CBLA-14	549.74	3.69	CBLA-110	502.70	3.54	CBLA-178	247.44	5.25
CBLA-15	647.27	3.5	CBLA-113	362.85	3.75	CBLA-179	172.88	4.3
CBLA-47	783.59	3.31	CBLA-117	455.40	3.56	CBLA-183	491.17	3.53
CBLA-62	713.33	3.37	CBLA-122	698.33	3.39	CBLA-187	654.03	3.95
CBLA-66	744.49	3.34	CBLA-124	829.23	3.31	CBLA-191	696.47	4.01
CBLA-67	455.26	3.64	CBLA-127	161.39	4.61	CBLA-199	569.71	3.61
CBLA-68	716.79	3.32	CBLA-129	707.31	3.4	CBLA-200	751.92	4.3
CBLA-69	693.46	3.35	CBLA-131	440.36	3.56	CBLA-205	647.27	3.67
CBLA-70	718.97	3.46	CBLA-133	762.31	3.39			

En la tabla 6 se puede observar que las concentraciones de fósforo en el sobrenadante del medio líquido después de los 5 días de incubación, muestra una variabilidad desde 65.96 con la cepa CBNG-07 hasta 836.67 mg L⁻¹ con la cepa CBLA-109, e indica que las bacterias denominadas como CBLA 109 y CBLA 124 solubilizan la mayor cantidad de fosfato en comparación del resto de las bacterias evaluadas.

En esta misma tabla también se presentan los datos de pH finalizado el tiempo de incubación. Existe una caída del pH desde su valor inicial (pH 7) acompañando al proceso de solubilización de fósforo. Este comportamiento puede ser debido a la secreción de iones hidrógeno por las bacteria, que es uno de los mecanismos que han sido reportados como responsables de la solubilización de fósforo, para comprobar esta hipótesis se grafico el valor de pH final contra el fósforo disuelto (figura 6a) y se encontró que si había una línea de tendencia marcada en cuanto a menor pH, mayor fósforo disuelto, sin embargo varias cepas tuvieron desviaciones en este comportamiento, por lo que se realizó otra gráfica sin incluirlas y se obtuvo la gráfica 6b, donde se observa una mejor correlación entre la solubilización y el pH. Por lo que se puede decir que en las cepas incluidas el mecanismo principal de solubilización puede ser la secreción de iones hidrógeno (libres o en formando parte de ácidos orgánicos). Las cepas que no siguen este mismo comportamiento son las cepas CBLA-163 (*Pseudomonas migulae*), 187 (*Enterobacter* sp), 172 (*Pseudomonas* sp), 177 (*Pseudomonas mandeii*), 191 (*Pseudomonas plecoglossicida*), 200 (*Pseudomonas moselii*) y la CBNG-14 (*Pantoea* sp), en estas cepas se puede plantear la hipótesis de que existe otro mecanismo involucrado en la solubilización de fósforo, este efecto es más marcado en *Pseudomona moselii* (CBLA-200) y en *Pseudomonas* sp (CBLA-172), en las cuales se observa que el pH fue mayor de 4 y sin embargo solubilizaron más de 500 ppm, y con las otras cepas este valor de fósforo disuelto se alcanzó a un pH de 3.3 y 3.5 respectivamente. En estos casos se pudiera plantear que existe secreción de ácidos orgánicos capaces de coordinarse con calcio y liberar los iones fosfato a valores de pH mayores. (Bashan, 1998)

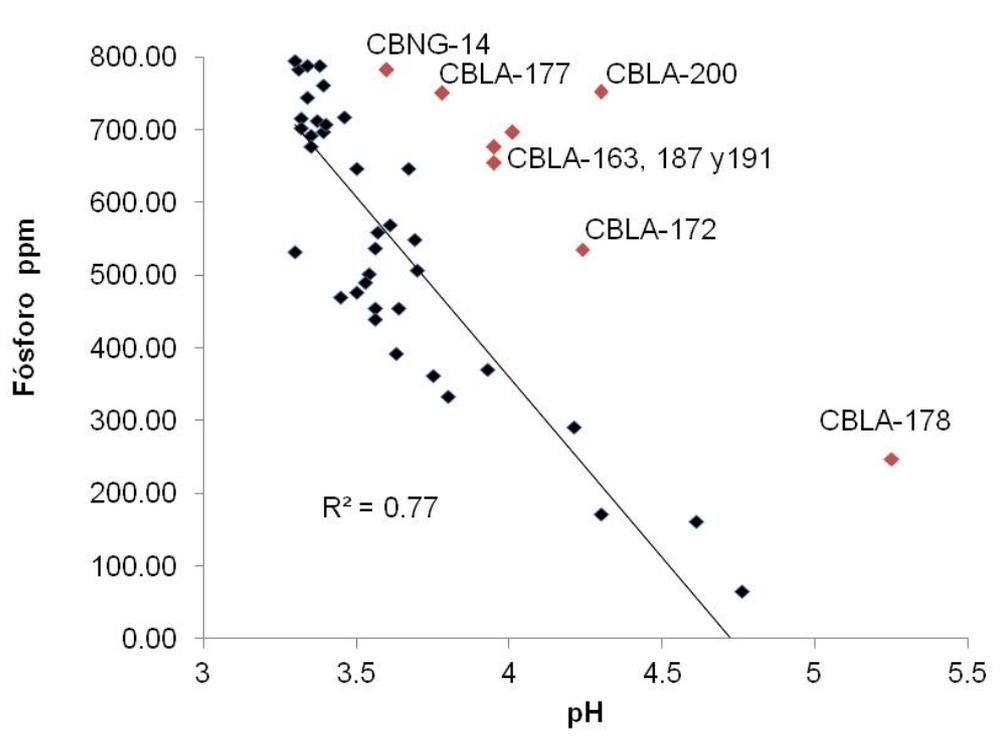


Figura 4. Correlación entre el pH y el fósforo disuelto con las diferentes cepas.

c. Identificación de las bacterias solubilizadoras de fósforo.

Todas las bacterias aisladas fueron bacilos, 40 mostraron ser Gram negativas y 4 fueron Gram positivas. Las colonias de los aislados eran redondas, cremosas, de color variante entre blanco y amarillo. La mayoría de ellas fueron catalasa positivo, 29 exhibían un metabolismo fermentativo y 2 aislados producían sulfuro de hidrógeno durante la fermentación de la glucosa. De acuerdo a estos resultados, la caracterización bioquímica fue cercana para *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Acinetobacter* y *Moraxella*. La identificación final en base a la secuenciación de ADN indica que la caracterización bioquímica estuvo muy cercana a la identificación de las bacterias. Con esta identificación se pudo encontrar que las bacterias solubilizadoras de fósforo son *Enterobacter spp*, *Bordetella sp*, *Pantoea spp*, *Moraxella spp*, *Pseudomonas spp*, *Alcaligenes spp* y *Bacillus spp*. Aislamientos de estas bacterias han sido encontrados en varios tipos de suelo y se han reportado sus capacidades solubilizadoras de fósforo (Rico, M. 2002). Sin embargo, *Pseudomonas moraviensis*, *Bordetella sp*, *Pseudomonas brassicacearu*, *Moraxella*, *Enterobacter ludwigii*, *Pseudomonas migulae*, *Pseudomonas mandei* y *Pseudomonas vranovensis* aún no han sido reportadas previamente. (Tabla 7).

Tabla 7. Identificación de las bacterias solubilizadores de fósforo mediante pruebas bioquímicas y de ADN.

Microorganismo	Bioquímica	DNA
CBNG-05	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas moraviensis (s)</i>
CBNG-06	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea spp (b)</i>
CBNG-07	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas sp (b)</i>
CBNG-08	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae (b)</i>
CBNG-11	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp(b)</i>
CBNG-12	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae (b)</i>
CBNG-14	NI	<i>Acinetobacter sp (b)</i>
CBLA-14	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae (b)</i>
CBLA-15	<i>Bordetella</i>	<i>Bordetella sp(b)</i>
CBLA-62	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas sp (b)</i>
CBLA-66	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas brassicacearum (s)</i>
CBLA-67	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae (b)</i>
CBLA-68	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae (b)</i>
CBLA-70	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp(b)</i>
CBLA-88	<i>Pseudomona</i>	<i>P.aeruginosa (b)</i>
CBLA-92	<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella (b)</i>
CBLA-97	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacteria (b)</i>
CBLA-100	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae (b)</i>
CBLA-107	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa (b)</i>
CBLA-109	<i>Pseudomona</i>	<i>Acinetobacter sp (b)</i>
CBLA-110	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
CBLA-113	<i>Pseudomona</i>	No identificadas
CBLA-117	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa (b)</i>
CBLA-122	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa (b)</i>

Microorganismo	Bioquímica	DNA
CBLA-124	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i> (s)
CBLA-127	<i>Bacillus</i>	No identificadas
CBLA-129	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> (b)
CBLA-131	<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella</i> (b)
CBLA-133	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i> sp
CBLA-134	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> (b)
CBLA-159	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas</i> sp (b)
CBLA-160	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas</i> sp (b)
CBLA-163	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas</i> sp (b)
CBLA-172	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas</i> sp (b)
CBLA-176	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas</i> sp (b)
CBLA-177	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>
CBLA-178	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp(b)
CBLA-179	<i>Pseudomona</i>	<i>Alcaligenes</i> (b)
CBLA-183	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas</i> sp (b)
CBLA-187	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas putida</i> (s)
CBLA-191	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacteria</i> (b)
CBLA-199	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas mandeii</i> (s)
CBLA-200	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas vranovensis</i> (s)
CBLA-205	<i>Pseudomona</i>	<i>Pseudomonas</i> sp (b)

VII. CONCLUSIONES.

Los resultados del presente estudio, indican las potencialidades de algunas bacterias existentes en la rizósfera de nicotiana glaucana, tomate y papa como agentes solubilizadores del fosfato. Esto sugiere la posibilidad de su empleo como inóculos para suelos alcalinos en los cuales se realicen enmiendas con roca fosfórica o $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fuente de fósforo. Las mejores bacterias solubilizadoras de fósforo fueron *Acinetobacter sp (b)* y *Enterobacter ludwigii (s)*, las cuales fueron capaces de solubilizar por encima de 800 mg L^{-1} de fósforo las CBNG 11, CBLA 47,66, 68, 75, 100, 109, 124, 177, 200 en medio NBRIP . De entre las bacterias encontradas *Pseudomonas moraviensis*, *Bordetella sp*, *Pseudomonas brassicacearu*, *Moraxella*, *Enterobacter ludwigii*, *Pseudomonas migulae*, *Pseudomonas mandei* y *Pseudomonas vranovensis* aún no han sido reportadas como BSP.

VIII. RECOMENDACIONES

Hay tres áreas prioritarias para el desarrollo de biofertilizantes: investigación para encontrar nueva cepas, pruebas en campo abierto e invernadero para comprobar la efectividad biológica de las cepas e investigación sobre el manejo integrado del fósforo.

Las bacterias aisladas de la rizósfera de tomate, papa y nicotiana glauca probadas en el experimento, demostraron la capacidad de solubilizar fósforo in vitro en intervalo de los 500-700 ppm, sin embargo y debido a que algunas de estas cepas son patógenas, se recomienda seleccionar aquellas que no lo sean para formular un producto a base de estas bacterias (*Pseudomonas* y *Acinetobacter*) y probarlas en experimentos in vivo ya sea en invernadero y campo, para demostrar su capacidad.

en la asimilación de fósforo por las plantas, se recomienda su uso en plantas de tomate debido a la importancia comercial de esta hortaliza.

Se sabe que existen factores nutricionales y climáticos que afectan la fijación de fósforo en solanáceas. Se necesitan estudios en los cuales se introduzcan estos factores como variables para validar la efectividad in vivo de estas cepas.

IX. BIBLIOGRAFIA.

AGROPECT, Star, 2002. Potasio (en línea) Dirección

[URL:<http://www.agropectstar.com/portal/doctos/agronomias.htm](http://www.agropectstar.com/portal/doctos/agronomias.htm)

(Consulta 04 mayo 2012).

Alexander M. 1980. Transformaciones microbianas del fósforo. (p.: 355- 371).

En: Introducción a la microbiología del suelo. AGT editor, México, 491 pag

Alexander, M.1987. Introduction of soil microbiology. New York Ed. Wiley ans
Sons p. 83-88.

Ahmed, N., Shahab, S., *The Internet Journal of Microbiology*. 2011, 9, 1.

Monografía del tomate <http://portal.veracruz.gob.mx/pls/portal/docs/>

Arellano-Gil, M. Y Gutierrez-Coronado, M., 2003. Rendimiento y calidad postcosecha de tomate bajo diferentes esquemas de fertilización al suelo. Revista Chapingo, serie Horticultura. 12(1), p. 113-118.

Asociation California Fertilizar. 1995. Manual de fertilizantes para Horticultura, soil improvement committee, california fertillizer association. Ed. Limusa, S.A. de C.V. México D.F. p. 93-94.

Bashan, Y. 1998. Inoculantes de bacterias promotoras de crecimiento vegetal para su uso en la agricultura.16: 729-770.

- Begonia, M., Begonia, G.; Miller, G.; Gilliard, D. y Young, C. 2004. Phosphatase Activity and Populations of Microorganisms from Cadmium – and Lead Contaminated Soils. Bull. Environ. Contam Toxicol. 73: 1025-1032.
- Chen, Y.; Rekha, P. ;Arun, A.; Shen, F; LAI, W. y Young, C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology 34: 33-41.
- Conney, M 2000. Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio. Ed Paraninfo. Madrid España. Pág 178-182.
- Diaz, P., Ferrera R., Almaraz G. 2001.La inoculación de bacterias promotoras de la planta growth de la lechuga. 19: 327-335.
- Douglas Horton, 1992. La papa Producción ,Comercialización y Programas. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima Hemisferio Sur, Montevideo. 50 pp.
- Drouillon, M. Y Mercry, R 2003. El papel del ácido cítrico en la movilización del fosfato de óxido de hierro. Ciencia del suelo Society of America Diario 70: 222-234.
- Eira, F. 1992. Solubilización microbiana de fosfatos. En Microbiología de suelos. Sociedad Brasileña de Ciencia del suelo. Campinas, Brasil. 62 p.
- Elías Afif Khouri. 2005. Dinámico del fósforo en suelos cálcicos de áreas mediterráneas. Ediciones de la Universidad de Oviedo Servicio de

publicaciones de la U.O. Campus de Humanidades. Edificio de servicios 33011 oviedo. 91 pp.

Fao. 2001. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Los mercados mundiales de frutas y verduras orgánico. Roma Italia. <http://fao.org>

Fankem, H.; Nwaga, D; Deubel, A.; Dieng, L.; Merbach, W Y Etoa, F.X. 2006. Ocurrencia y el funcionamiento de los microorganismos solubilizadoras de fosfato a partor de aceite de palmera Diario de Africa Biotecnologia 5 (24): 2450-2460.

Fernández, L., Zalba, P., Gómez, M. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelo de la región sojera. Cienc Suelo 23 (1):31-37.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Asociación Internaonal de la Industria de los fertilizantes. 2002. Los Fertilizantes y su uso: Una guía de bolsillo para los oficiales de extensión. Cuarta edición. Pág.1-8.

García, C. 2003. Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. P 49-58.

Garza-Arizpe, M., Molina-Velázquez, M. Manual para la producción de tomate en invernadero en suelo en el estado de Nuevo León. Facultad de Agronomía. UANL. 2008.

- Garzón, T., JA; Bujanos M.; Marin J.A. 2007. Manejo Integrado de la paratritioza *B. cockerelli* Sulc. INIFAP, Campo Experimental valle de Culiacán, Culiacán Sin., México, Folleto para productos Núm. 54-24 p
- Gómez, Y. 2004. Actividad de las fosfatasas ácidas y alcalinas (extracelulares e intracelulares) en los hongos de la rizosfera de *Arachis hypogaea* (Papiloneaceae). *Rev.Biol. Trop.* 52 (1): 287-295.
- Guerrero, A., 1990. El suelo, los abonos y la fertilización de los cultivos. Ed. Mundi-prensa. Pp. 53
- Glick, B.R.1995.The enhancenment of plant growth by free-living bacteria.can *J.Microbiol.* 41:109-117. Canada.
- Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O., Wani, P., Reddy G. 2006. Growth promotion of Maize by Phosphate – Solubillizing bacteria isolated from compost and macrofauna. *Microbial Research.*
- Illmer P, Schinner F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 24:389-395.
- Ivanova, R.; Bojinova, D.; Nediaalkoba, K. 2006. Roca fósforica de solubilización por las bacterias del suelo, *Diario de la Universidad de la Tecnología Química.*41 (3): 297-302.
- Johnson, S.E. Y Loeppert, R.H 2006. Role of Organic Acids in Phosphate Mobilization from Iron Oxide. *Soil Science Society of America Journal* 70: 222-234.

- Kloepper, J., Lifshitz, R. and Zablutowicz, R. 1989. Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7: 39-44. U.S.A.
- Kpombekou-A, K y Tabatabai, M.A., 1994. Efecto de los ácidos orgánicos sobre liberación del fósforo de la roca fosfórica. *Soil Sci.* 158, 442-453.
- Martinez Farias. 2004. Fósforo total, fósforo orgánico y fosfatasa ácida en entisoles, alfisoles y vertisoles de corrientes con diferentes usos agrícolas. *Comunicaciones científicas y tecnológicas. Resumen A-066.*
- Megel, K y Kirby, A., 1982. *Principles of Land Nutrition.* 2nd Edition. Editores: International Potash Institute. P. 347-360 USA.
- Mikanová, O y Nováková, J, 2002. Evaluation of the P. Solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. *Rostlinná Vyroba* 48(2): 397-400.
- Moura R., Martin J., Martin A., y Liras P. 2001. Substrate analysis and molecular cloning of the extracellular alkaline phosphatase of *Streptomyces griseus*. *Microbiologia.* 147: 1525-1533.
- Nee, M., 1986. Solanaceae I (III). En: Sosa, V. (ed.). *Flora de Veracruz.* Fascículo 49. Instituto de Ecología . Xalapa, Veracruz, México.
- Onthong, J.; 2007. Effect of pH and some cations on activity of acid phosphatase secreted from *Ustilago* sp. Isolated from acid sulphate soil. *Songklanakarin J. Sci. Technol* 29: 275-286.

- Otalara J., Datiño L., Martínez, M., and Pedroza, A. 2003. Standardization of a qualitative technique of producing phosphatases produced by phosphate solubilizing microorganisms. Under graduate thesis requirement for choosing the title of Industrial Microbiologist. Faculty of Pontificia Universidad Javeriana. Bogota-Colombia.
- Okon Y and Labandera-Gonzalez CA 1994. Agronomic applications of azospirillum: and evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Sol. Biol. Biochem .26, 1591- 1601.
- Oviedo, M., E. Iglesias. 2005. Utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo en cultivo de raygrás. Universidad Nacional del nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.
- Peix A, Rivas-Boyer A A, Mateos P F, Rodríguez-Barrueco C, Martínez-Molina E, Velazquez E. 2001. Crecimiento promoción de grabanzos y cebada por una cepa de solubilización de fosfato en condiciones de cámara de crecimiento. 33:103-110.
- Picone,L., Zamuner, E. 2002. Fósforo organic y fertilidad fosfórica. Informaciones del Cono Sur 16:11-15.
- Rashid, M.; Khalil,S.; Ayub, N.; Alam, S. y Layif,F. 2004. Organic Acids Production and Phosphate solubilization by phosphate solubilizing Microorganisms (PSM) under in vitro Conditions. Pakistan Journal of Biological Sciences 7(2):187-196.

- Rico, M. 2002. Fundamentos de microbiología. 1° edición. Ed Ceja Bogotá 21pp.
- Ridge y Rovira, 1971. Phosphatase activity of intact Young wheat roots under sterile and non-sterile conditions. *New Phytol.* 70:1017-1026.
- Robert Graham. 1826. *The Edinburgh New Philosophical Journal.*
- Rodríguez H, Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* 17:319-339.
- Ruano, J. R. 2008. *Viveros Forestales.* Madrid España Ediciones Mundi – Prensa. 2. Pag. 34.
- Rueda, R, Romero G, Saldaña A y R Vázquez. 2009. Producción de papa en función de fertilizante y composta en Puebla, México. IV Reunión Nacional de Innovación agrícola y Forestal. Saltillo Coahuila.
- Rossi, S.; Rollán, A; Y Bachmeler. A. 2006. Biodisponibilidad de fósforo en un suelo del sur de Santa Fe. Argentina) Efectos de dos fuentes fosfatadas y sus mezclas con urea. *Agriscientia* 23(2): 91-97.
- Sylvia D., Fuhrmann J., Hartel P., Y Zuberrer D. 2005. *Principles and applications of soil microbiology.* Second. Edition. Prentice Hall. New Jersey. Págs. 464-466.
- Ta- Fa Lin, Hsin-I Huang, 2005. Departamento de Suelos y Ciencias del Ambiente, 2006. Universidad Nacional Chung Hsing, 250, Kuo, Kaung Road, Taichung, Taiwan 40227, ROC 957. 960.

- Terry A.E., Leyva A., Hernández A. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*lycopersicón esculentum Mill*) revista colombiana de biotecnología. Universidad Nacional de Colombia vol. VII N°2.
- Teuscher, H., Adler R., Seaton, J.P. 1965. El suelo y su fertilidad. Compañía Editorial Continental, S.A. pp. 249.
- Vasquéz P, Holgun G., Puente M., Lopez A., y Bashan Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biol. Fertil. Soils. 30: 460-468.
- Vera, D.; Pérez, H y Valencia, h. 2002. Aislamiento de hongos Solubilizadores De Fosfatos De la Rizosfera De Arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). Acta Biologica Colombiana 7 (1): 33-40.
- Villanueva, L; Carrasco, M. 2001. Evaluación del impacto de los fertilizantes fosforados en la acumulación de cadmio en suelos cultivados de maíz (*Zea mays*). Tesis para optar el grado de Magister en Gestión y Planificación Ambiental. Departamento de Posgrado y Postítulo. Programa Interfacultades. Universidad de Chile.
- Villaseñor R., J. L. y F. J. Espinosa G., 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de cultura Económica. México, D.F.

Young, 1990. Effects of phosphorus-solubilizing bacteria and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of tree species in subtropical Soils. Plant Soil 95, 245-254.

Recursos electrónicos:

- www.porquelabiotecnologia.com
 - <http://www.clades.cl/revistas/8/rev8art4htm>
 - <http://fao.org>
 - SIAP (Servicios de información agroalimentaria y pesquera), 2010. <http://www.siap.gob.mx>
- CONPAPA, 2008. Comité Nacional Sistema Producto Papa.
- http://www.conpapa.org.mx/pdf/publi_ManualParatrioza.pdf.

